

福山大学生命工学部年報 (12), 1-16 (2013)

## 出芽酵母において染色体からのセントロメア DNA の 切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析

宮本昭弘, 柳本敏彰, 秦野琢之, 松崎浩明\*

遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐため染色体からセントロメア DNA を切り出して細胞死を誘導することで遺伝子組換え生物に条件致死性質や不稔性質を付与することが効果的であると考えられる。そこで、我々は、*Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として部位特異的組換えを利用して特定の条件下で染色体からセントロメア DNA を切り出して細胞死を誘導することを検討している。一倍体細胞において第 IV 番染色体上のセントロメア DNA の両側に組換え標的部位 (RS) を挿入し、ガラクトースによってセントロメア DNA の切り出しが誘導される株を作製した。この細胞で、切り出しを誘導することによって生存率が大きく低下し、細胞死を起こすことができる。しかし、プレート上で僅かな数のコロニーが出現するので、生存細胞が出現する原因を解析した。生存細胞の 5 個のクローンについてセントロメア DNA 近傍の PCR 解析から 1 個で切り出しが起こっており、他の 4 個では切り出しが起こっていなかった。シーケンス解析から切り出しの起こらなかった 4 個では、全てのクローンで 2 個の RS のうち 1 個が染色体から欠失していることが判明した。RS の欠失を抑制することで生存率をさらに低下できる可能性が示唆された。

キーワード：細胞死, 生存細胞, セントロメア, 部位特異的組換え

遺伝子組換え技術は、生物に外来遺伝子を導入して品種改良や有用物質の生産を行う優れた技術である。今日、医薬品や酵素剤の製造および農業などにおいて多数の遺伝子組換え生物が利用され、また、遺伝子組換え生物の大量培養や大量栽培が著しく増加している。これにより、遺伝子組換え生物が野外で拡散した場合に自然環境へ影響を及ぼし生態系のアンバランスが生じる危険性が懸念されている。野外での拡散を防ぐ対策として遺伝子組換え生物の隔離や封じ込めが実施されている。しかし、さまざまな拡散防止策を何重にも施して拡散防止をより完全にする必要がある。我々は、拡散防止策の一つとして遺伝子組換え生物に条件致死性質や不稔性質を付与することが有効であると考えた。これらの付与は、部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメア DNA を切り出し、細胞死を誘導することで可能である。そこで、我々は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの部位特異的組換え系を利用して染色体からセントロメア DNA を切り出すことによ

---

〒729-0292 福山市学園町 1 番地三蔵 福山大学生命工学部生物工学科.

\*Tel: +81-84-936-2111, Fax: +81-84-936-2023, E-mail: [matsuzak@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp](mailto:matsuzak@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp)

て、細胞死を誘導するシステムを開発することを検討している。pSR1 プラスミドは、酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 由来であり、pSR1 の部位特異的組換え系は、R レコンビナーゼが特異的な塩基配列の組換え標的部位 (RS) を認識し、2 個の RS 間で組換えを起こすため<sup>1,2)</sup>、染色体の人為的な改変技術に利用できる。*S. cerevisiae* では、すでに pSR1 プラスミドの部位特異的組換えを利用した染色体操作法が開発されている<sup>3,4)</sup>。染色体上の組換えを起こしたい標的部位 2 ヶ所に RS (一般に RS を含む 58 bp DNA を使用) を挿入した後、この細胞へ R レコンビナーゼを発現するプラスミド (R-発現プラスミド) を導入する。レコンビナーゼの発現を誘導することにより 2 個の RS 間で部位特異的組換えが起こり、染色体が改変される。RS の染色体上での位置と向きに応じて切り出し、逆位、および非相同染色体間での組換えが可能である。また、この組換えシステムは植物細胞でも機能する<sup>5,6)</sup>。

*S. cerevisiae* のセントロメア DNA は、染色体上にある特異的な配列で、種々のタンパク質が結合してキネトコア複合体を形成し、有糸分裂時および減数分裂時に伸長した紡錘体微小管が結合して染色体が分離され、極めて重要な役割を果たしている<sup>7-9)</sup>。*S. cerevisiae* の一倍体細胞は、16 本の染色体があり、各染色体上にセントロメアが 1 個存在している。セントロメア DNA は、すべて約 120 bp のサイズで CDE I, CDE II, および CDE III の 3 つのエLEMENT から構成され、共通構造を有している。CDE II は 78 ~ 86 bp の A と T に富む配列である。8 bp の CDE I と 25 bp の CDE III は非常に高い共通配列を持ち、多数のタンパク質が結合してキネトコア複合体が形成される。このキネトコア複合体が微小管と結合する足場となるため、セントロメア DNA を失った染色体は有糸分裂時に正確に分配されず、染色体が容易に細胞から脱落し、細胞は生育に必須な遺伝子を多数失うため生育困難に陥り、致死となる。したがって、部位特異的組換えを利用して染色体からセントロメア DNA を切り出すことで条件的に細胞死を誘導することが可能である。

出芽酵母 *S. cerevisiae* の一倍体細胞において第 IV 番染色体上のセントロメア DNA の両側に RS を挿入し、さらに R-発現プラスミドを導入した株を作製した。この株は、ガラクトースによってレコンビナーゼ遺伝子 (R) を発現させることで染色体からセントロメア DNA の切り出しを誘導することができる。まず、一倍体細胞において第 IV 番染色体からセントロメア DNA の切り出しを誘導することで生存率が大きく低下し、細胞死を起こすことに成功した。また、第 V 番染色体からの切り出しによっても細胞死を起こすことができた。さらに、二倍体細胞で第 IV 番相同染色体からセントロメア DNA を切り出すことを検討した。二倍体細胞の場合、相同染色体の両方から切り出すことで細胞死を起こすことができた。しかし、二倍体細胞での生存率は、一倍体細胞よりも高くなった。細胞死を誘導してもわずかに生存細胞が出現するので、本研究では、細胞死誘導の効率を改善するために生存原因を調べた。一倍体細胞においてプレート培養で第 IV 番染色体からセントロメア DNA を切り出した際に出現した生存細胞について、R-発現プラスミドの機能や染色体の構造について解析した結果、主な生存原因が第 IV 番染色体からの RS の欠失であることが分かった。

## 材料と方法

**使用菌株、プラスミド、およびオリゴヌクレオチド** 本研究で使用した酵母および大腸菌を表 1 に、プラスミドを表 2 に、オリゴヌクレオチドを表 3 に示す。

表 1 使用菌株のリスト

菌株	遺伝子型	由来
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
KA311A	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 pho3-1 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i>	10)
YCD100	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i>	本研究
	<i>CEN4::[RS-CEN4-HIS3-RS]</i>	
YCD101	<i>MATa his3-532 leu2-3,112 trp1-289 ura3-1,2 pho3-1</i>	本研究
	<i>CEN4::[RS-CEN4-HIS3-RS] pHM209</i>	
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\phi</math>80 <i>lacZ</i><math>\Delta</math>M15) <i>hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i></i>	11)

表 2 使用プラスミドのリスト

プラスミド	特徴	由来
pHM209	2 $\mu$ m-ARS <i>STB P<sub>GALI</sub>-R TRP1 amp<sup>r</sup> ori</i>	10)
pHM153	2 $\mu$ m DNA-ARS <i>STB P<sub>GALI</sub>-R LEU2 amp<sup>r</sup> ori</i>	3)

表 3 使用オリゴヌクレオチドのリスト

オリゴヌクレオチド	塩基配列
CEN4Pvu	5'-GTGGTCAGAACACAGTTAG-3'
CEN4Hpa	5'-TACTCCAGGTACAGTCCTCT-3'
HIS3RSseq	5'-CCTCCACCAAAGGTGTTCTT-3'
CEN4P51	5'-AACTGTGACCGATAAAACCGG-3'
CEN4P31	5'-TGTATGTCCATGATTCGCCG-3'
CEN4CDERC	5'-TTTTATGTTTCGGTAATCATAAACA-3'
CEN4CDELC	5'-GTCACATGCTTATAATCAACTTTTT-3'
HIS3code5	5'-TAGCGATAGAGCACTCGATC-3'
HIS3code3	5'-AGGTGGCTTCTCTTATGGCA-3'

染色体からのセントロメア DNA の切り出しによる細胞死の誘導を行った *S. cerevisiae* YCD101 株は、KA311A 株の染色体上の *CEN4* DNA が RS-*CEN4*-*HIS3*-RS DNA で置換され、さらに *GAL1* プロモーターの下流に *R* 遺伝子 (レコンビナーゼ遺伝子) が連結された *R*-発現プラスミド pHM209 (*TRP1* マーカー) が導入されている。さらに、YCD101 株において SGal プレート培養で第 IV 番染色体からのセントロメア DNA の切り出しを誘導して出現したコロニーの細胞を生存細胞クローンとして生存原因の解析に使用した。また、生存細胞における *R*-発現プラスミドの機能の解析において、生存細胞クローンに pHM209 と選択マーカーの異なる pHM153 (*LEU2* マーカー) を導入した株および生存細胞から回収した pHM209 DNA を KA311A 株に導入した株を使用した。酵母の形質転換は酢酸リチウム法で行った<sup>12)</sup>。*S. cerevisiae* や *Escherichia coli* における菌株作製、プラスミド作製、細胞からの DNA 調製は、一般的な方法に従った<sup>11,13)</sup>。

**セントロメア DNA の切り出しによる細胞死のアッセイ** セントロメア DNA の切り出しにおいて、細胞死が起こるかをプレートアッセイと液体培養とで調べた。酵母菌体を SRaf-*trp* (炭素原として 5% ラフィノースを含むトリプトファン無添加の合成培地) 液体培地 5 ml に植菌し、28℃で2日間振とう培養した。各培養液の細胞濃度を等しくするため培養液の 660 nm 波長における濁度 (OD<sub>660</sub>) が 0.8 となるように無菌水で調整した後、さらに無菌水で 10 倍、100 倍、および 1,000 倍希釈し、各希釈液 50  $\mu$ l を 5% SGlc-*trp* (炭素原として 5% グルコースを含むトリプトファン無添加の合成培地) プレートと 5% SGal-*trp* (炭素原として 5% ガラクトースを含むトリプトファン無添加の合成培地) プレートに 3 枚ずつ塗布した。5% SGlc-*trp* プレートは 28℃で3日間静置培養し、5% SGal-*trp* プレートは 28℃で5日間静置培養した。生存率は、プレート上に出現したコロニーの個数を計数して計算し、SGlc-*trp* プレートに出現したコロニーの個数に対する SGal-*trp* プレートに出現したコロニーの個数の比として表した。各アッセイで数枚のプレートを使用して 300 個以上の細胞を調べた。実験は、個別に 3 回以上行い、生存率は平均値を用いた。

**生存細胞の解析 (1) PCR 法による解析** YCD101 株の細胞死のプレートアッセイで出現した生存細胞クローンのセントロメア領域の構造を生存細胞クローンのゲノム DNA を鋳型とし、CEN4Hpa と CEN4Pvu をプライマーとした PCR 法で解析した。PCR 法は Saiki らが開発した方法<sup>14)</sup>を一部改変して行った。PCR 反応の忠実度を高めるために、酵素に $\alpha$ 型 DNA ポリメラーゼである KOD DNA polymerase (KOD-plus-Ver2) を使用し、増幅装置はサーマルサイクラー Wako WK-0232 (和光純薬工業) を使用した。0.2 ml 容 MicroAmp リアクションチューブに 10 倍濃度 KOD plus 緩衝液 5  $\mu$ l、dNTP 混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP がそれぞれ 2.0 mM の混合液) 5  $\mu$ l、25 mM MgSO<sub>4</sub> 3  $\mu$ l、プライマー (2 種類; 20~23mer、20 pmol/ $\mu$ l) 各々 0.75  $\mu$ l、鋳型 DNA (50 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l をとり、滅菌水 34.5  $\mu$ l を加え全量を 50  $\mu$ l とした。KOD DNA polymerase 1  $\mu$ l を加え、ピペッティングで軽く攪拌した後、増幅装置にセットし、94℃で4分間プレ加熱を行った後、二本鎖 DNA の熱変性を 98℃で 10 秒間、プライマーのアニーリングを 58℃

で 30 秒間、相補鎖 DNA の伸長・合成を 68°C で適当な時間 (増幅 DNA 1 kb 当たり 1 分間) のサイクルを 25 サイクル繰り返した。72°C で 10 分間ポスト加熱を行った。増幅 DNA のサイズをアガロースゲル電気泳動で解析した。増幅 DNA のサイズは、セントロメア DNA の切り出し誘導前の YCD101 株では 3.0 kb であり、もし、セントロメア DNA の切り出しが起これば、0.8 kb と小さくなる。また、生存細胞クローンにおいて *CEN4* DNA が存在するかを決定するために、ゲノム DNA を鋳型とし、*CEN4* の centromere DNA element (CDE) の両端部分の CEN4CDERC と CEN4CDELIC をプライマーとした PCR 法で解析した。

**(2) DNA のシーケンシングによる解析** 一倍体細胞でセントロメア DNA の切り出しを誘導した時に生じた生存細胞クローンにおいて 2 個の RS 領域の DNA のシーケンシングを行った。左腕にある RS DNA では、Watson 鎖と Crick 鎖の塩基配列は、それぞれプライマー CEN4Pvu と CEN4P31C を使用して決定した。また、右腕にある RS DNA では、Watson 鎖と Crick 鎖の塩基配列はそれぞれプライマー CEN4Hpa と HIS3RSseq を使用して決定した。DNA のシーケンシングはオートシーケンサーを使用し、シーケンシング反応はジデオキシ法<sup>15)</sup>を改変したサイクルシーケンシング法で行った。シーケンシング反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied biosystems, Foster, CA, U. S. A.) を使用し、Applied biosystems の添付説明書の反応プロトコールを改変して、スケールを 2 分の 1 にして行った。0.2 ml 容 MicroAmp リアクションチューブにプライマー (20 mer、0.5 pmol/μl) 3 μl、鋳型 DNA 250 μg、ターミネータープレミックス [A, G, C, T-BigDye Terminator、dGTP、dATP、dTTP、dCTP、トリス-塩酸緩衝液 (pH9.0)、AmpliTaq DNA polymerase 4 μl を混合し、無菌水を加えて全量を 10 μl とした。GeneAmp PCR System 2400 を用いて PCR 反応を行い、DNA をラベリングした。PCR 反応は、二本鎖 DNA の熱変性を 95°C で 10 秒間、プライマーのアニーリングを 50°C で 5 秒間、相補鎖 DNA の伸長・合成を 60°C で 4 分間の反応を 1 サイクルとして 25 サイクル繰り返して行った。PCR 反応液 10 μl を 1.5 ml 容マイクロチューブに移し、さらに、3 M 酢酸ナトリウム水溶液 1 μl、95% エタノール 25 μl を加えて混合した後、室温で 15 分間放置した。遠心分離 (15,000 rpm、20 分間) し、上澄みをピペットマンを用いて除いた。70% エタノール 125 μl を加え、遠心分離 (15,000 rpm、5 分間) して DNA を沈殿として回収した。DNA を減圧下で乾固した。DNA 沈殿に HiDi ホルムアミド 18 μl を加え 20~30 回ピペッティングして溶解し、DNA 溶液を Genetic アナライザーチューブに移し、チューブセプタでしっかりと蓋をした。このサンプルをキャピラリーシーケンサー (ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer : アプライドバイオシステムジャパン) にセットし、キャピラリー電気泳動および DNA 塩基配列の決定を行った。DNA 塩基配列は、Genetyx-Mac Ver. 10.1 (ゼネティックス株式会社) を用いて解析した。

**パルスフィールドゲル電気泳動による染色体パターンの解析** パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 用の酵母染色体 DNA の調製は、Carle と Olson の方法<sup>16)</sup>を一部改変して行なった。パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) は CHEF (Counter clamped homogeneous electric fields) 法<sup>17)</sup>で行い、装

置は CHEF-DR™II (Bio-Rad laboratories, CA, U. S. A.) を使用し、設定は CHEF-DR™II の使用説明書に従って行った。まず、泳動槽内に予め 4℃ に冷却しておいた 0.5×TBE 泳動用緩衝液 {10×TBE 緩衝液 [0.9 M Tris-HCl (pH8.3)、0.9 M ホウ酸、25mM Na<sub>2</sub>EDTA] 125 ml に脱イオン水 2,375 ml を加えて希釈した溶液} 2.5 l を満たし、泳動槽と冷却装置の間を循環させ、蒸留水 95 ml に Seakem LE agarose 1 g を加え沸騰水浴で溶解した後、10×TBE 緩衝液 5 ml を加え、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 用 1% (w/v) アガロースとした。酵母染色体 DNA を包埋したゲル断片を、アガロースのウェルに差し込み、全てのウェルの隙間に、溶解後約 35℃ までに冷却した 0.8% (w/v) 低融点アガロース (SeaPlaque GTG agarose) 水溶液を注ぎ込み、室温で約 30 分間静置して固化させ、ウェルの隙間を埋めた。泳動用緩衝液の温度を 14 ℃ 設定し、アガロースゲルを泳動槽にセットし、定電圧 200 V, パルスタイム 60 秒で 16 時間、定電圧 200 V, パルスタイム 90 秒で 10 時間泳動を行なった。泳動後、アガロースゲルを 0.5 mg/ml 臭化エチジウム水溶液に 30 分間浸し、染色した。ゲルを脱イオン水で洗浄した後、トランスイルミネーターでゲルを UV 照射し、Printgraph により画像を取り込み、その画像をプリントアウトし、DNA のバンドを解析した。解析後、ゲルをナイロンメンブレンにブロッティングし、*CEN4* DNA および *HIS3* DNA をプローブとしたサザン解析を行なった。

**パルスフィールドゲル電気泳動で分離した染色体 DNA のサザン解析 (1) ジゴキシゲニンで標識された DNA の調製** サザン解析に使用した標識プローブは Digoxigenin-11-dUTP 混合液を用いた PCR 法で作製した。*CEN4* DNA プローブは、プライマーとして CEN4P51 と CEN4P31 を使用した PCR で増幅した 513 bp DNA であり、*HIS3* DNA プローブは、プライマーとして HIS3code5 と HIS3code3 を使用した PCR で増幅した 531 bp DNA である。DIG-dUTP を含む dNTP 混合液 (DIG-dNTP 混合液) は、1.5 ml 容マイクロチューブに 100 mM dATP、100 mM dCTP、100 mM dGTP を各々 1 µl、100 mM dTTP 0.95 µl、1 mM DIG-dUTP [alkali-labile (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)] 5 µl を加えて、無菌水で全容を 40 µl として調製した。0.2 ml 容 MicroAmp リアクションチューブ (Applied biosystems, Foster, CA, U. S. A.) に 10×*Ex Taq* 緩衝液 5 µl、DIG-dNTP 混合液 4 µl、プライマー (2 種類; 20 pmol/µl) 各 2 µl、鋳型 DNA (50 pg/µl) 1 µl を入れ、無菌水を加えて全容を 50 µl とした後、ピペッティングによって混合した。*KOD* DNA polymerase [5 U/µl] 0.5 µl を加え、ピペッティングにより穏やかに混合した。94℃ で 4 分間プレ加熱した後、二本鎖 DNA の熱変性を 94℃ で 1 分間、プライマーのアニーリングを 57℃ で 1 分間、DNA 鎖の伸長を 72℃ で 4 分間の反応を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返し、72℃ で 10 分間ポスト加熱を行った。PCR 法による増幅 DNA のサイズと量をアガロースゲル電気泳動で確認後、反応液をマイクロチューブに移した。DNA 溶液に 0.2 M Na<sub>2</sub>EDTA (関東化学株式会社) (pH8.0) 4.6 µl、4 M 塩化リチウム 5.8 µl、および 99.5% エタノール 120 µl を加えて混合し、-80℃ で 10 分間放置した後、遠心分離 (13,000 rpm、10 分間: MX-100 微量高速冷却遠心機) し、DNA を沈殿として回収した。DNA 沈殿を 99.5% エタノールでリンスした後、減圧下で乾固した。DNA を TE 緩衝液 (pH8.0) 50 µl に溶解し

て標識プローブ DNA としてサザンハイブリダイゼーションに用いた。 **(2) DNA のメンブレンへのプロッティング** アガロースゲル上の DNA のメンブレンへの移行は Southern の方法<sup>18)</sup>を一部改変し、バキュームトランスファー装置 (BC - 650: バイオクラフト) を使用して行った。アガロースゲル電気泳動後のゲルを 0.25 N 塩酸に浸し、30 分間穏やかに振とうして DNA を断片化した。ゲルを脱イオン水で 2 回洗浄した。ゲルを変性溶液 (1.5 M 塩化ナトリウム、0.5 M 水酸化ナトリウム) に浸し、室温で 30 分間穏やかに振とうして DNA を変性させた。ゲルを脱イオン水で 2 回洗浄した。中性溶液 [3 M 塩化ナトリウム、0.5 M トリス-塩酸 (pH7.0)] に浸し、30 分間穏やかに振とうして中和させた。バキュームトランスファー装置の上に、下から順にシールシート、脱イオン水に浸したナイロンメンブレン (Pall Biotrans A membrane、孔径 0.2  $\mu\text{m}$ 、Biotrans Transfer membranes、Pall BioSupport Division; Glen Cove, NY, U. S. A.)、アガロースゲル、20 $\times$ SSC 溶液 [3 M 塩化ナトリウム、0.3 M クエン酸ナトリウム (pH7.0)] を含んだスポンジを重ね、バキュームトランスファー台に接続した真空ポンプで 40 分間吸引し (5 cm Hg)、ゲル中の DNA をメンブレンに移行させた。このメンブレンをサービスペーパータオルで挟み、80 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間以上加熱し、DNA をメンブレンに固定した。 **(3) サザンハイブリダイゼーション (メンブレンが 100  $\text{cm}^2$  の場合)** サザンハイブリダイゼーションは DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて行った。DNA が固定されたメンブレンとハイブリダイゼーション溶液 {5 $\times$ SSC [20 $\times$ SSC 溶液 (3 M 塩化ナトリウム、0.3 M クエン酸ナトリウム) を脱イオン水で希釈して調製]、1% (w/v) ブロッキング剤 [ブロッキングストック溶液 (バイアル 10 (not fat dry milk fraction) を終濃度 10% (w/v) となるように緩衝液 1 (0.1 M マレイン酸、0.15 M 塩化ナトリウム; pH7.5) に溶解したもの) を脱イオン水で希釈して調製]、1% (w/v) N-ラウロイルサルコシン、0.02% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)} 20 ml をメンブレンバッグに入れ、68 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間以上保温しプレハイブリダイゼーションを行った。メンブレンバッグの中にメンブレン、ハイブリダイゼーション溶液 3.5 ml を入れ、さらに、ジゴキシゲニンで標識したプローブ DNA ((1)で調製したジゴキシゲニンで標識した DNA) を沸騰水浴中で 5 分間加熱し変性させた後、氷中で急冷して使用]を最終濃度 25 ng/ml となるように加え、シールした後、68 $^{\circ}\text{C}$ で一晩放置してハイブリダイゼーションを行った。メンブレンバッグからメンブレンを取り出した後、0.1% (w/v) SDS を含む 2 $\times$ SSC 溶液に浸し、室温で 5 分間穏やかに振とうして洗浄した。この洗浄操作を 3 回行った。メンブレンを 0.1% (w/v) SDS を含む 0.1 $\times$ SSC 溶液に浸し、68 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間放置して洗浄した。この洗浄操作を 3 回行った。メンブレンを緩衝液 1 に浸して 1 分間放置し洗浄した。メンブレンを約 100 ml の緩衝液 2 [10% (w/v) ブロッキングストック溶液を緩衝液 1 で 10 倍希釈して調製] に浸し、室温で振とう (55 rpm、30 分間) した後、メンブレンをメンブレンバッグに入れ、抗体希釈液 {抗体溶液 [バイアル 8; ポリクローナル羊抗体、DIG Fab - Fragment AP - conjugate (750 U/ml)] を遠心 (10,000 rpm、5 分間) した後、上澄みを緩衝液 2 で 150 mU/ml となるように希釈した} 20 ml を加え、シールした後、室温で 30 分間放置した。メンブレンを取り出し、洗浄緩衝液[0.3% (v/v)

Tween-20 (ポリエチレン (20) ソルビタンモノラウレート) 0.9 ml を緩衝液 1 で希釈し全容を 300 ml として調製 (pH7.5) ] 100 ml で振とう (60 rpm、15 分間) した。この洗浄操作を 2 回行った。検出緩衝液 (0.1 M トリス-塩酸、0.1 M 塩化ナトリウム (pH9.5)) 20 ml で 3 分間メンブレンを平衡化し、メンブレンと CDP-star 溶液 [CDP-star (Roche Molecular Biochemicals, Germany) 10  $\mu$ l を検出緩衝液 1 ml に添加] 1 ml をメンブレンバッグに入れシールし、遮光して 25°C で 5 分間反応させた。メンブレンを新しいメンブレンバッグに移し、メンブレンの入ったバッグを増感スクリーン付きカセットに固定し X 線フィルム (Kodac Diagnostic Film X-Omat AR : Eastman Kodak, Rochester, NY, U. S. A.) を入れ室温で 30 分間感光させた。X 線フィルムを現像液 (レンドール : フジフィルム) に 1 分間浸け現像した後、停止液 [0.3% (v/v) 酢酸水溶液] に 1 分間浸け現像を停止させた。定着液 (レンフィックス : フジフィルム) に浸け定着させた後、水洗いして乾燥させた。

### 結果および考察

我々は、*S. cerevisiae* の一倍体細胞と二倍体細胞において、第 IV 番染色体からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導するシステムを既に確立している。一倍体細胞で細胞死を誘導するシステムは、大きく 2 つのステップからなる。まず、一倍体細胞で染色体上のセントロメア DNA の両側に RS を同方向で挿入し、さらに *GAL1* プロモーター制御下にレコンビナーゼ遺伝子 *R* が連結された *R*-発現プ

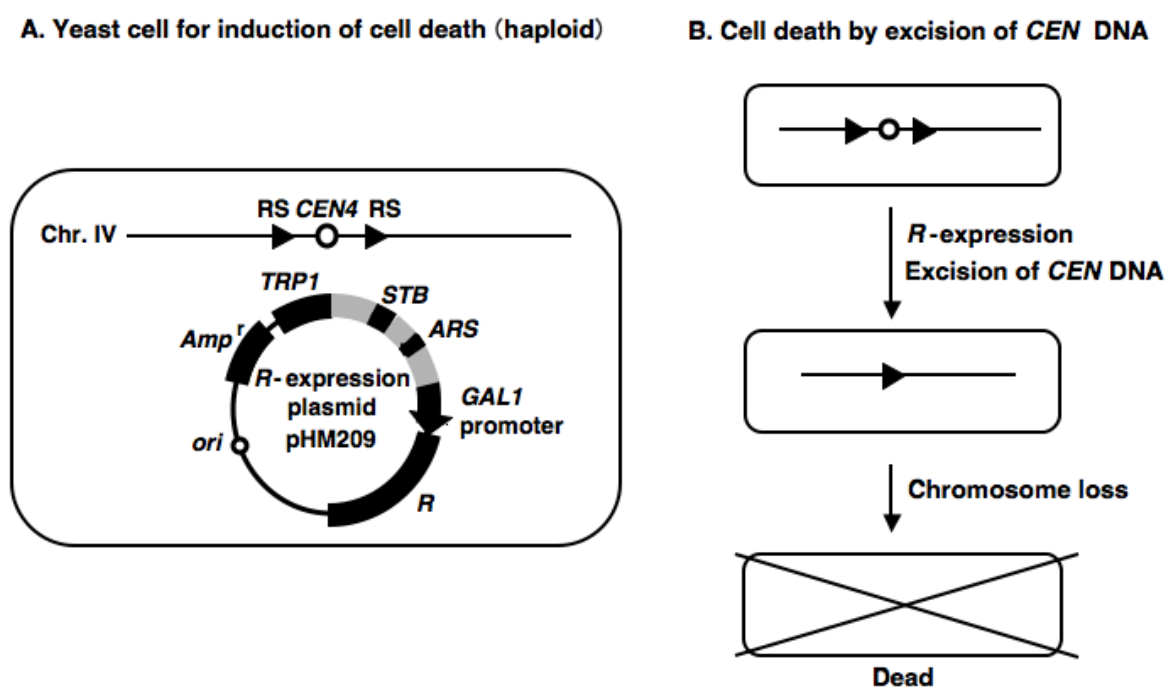


図 1 細胞死を誘導する方法



ラスミドを導入した株を作製する（図 1A）。次に、この細胞をガラクトース培地で培養してレコンビナーゼの発現を誘導するとレコンビナーゼが RS に作用して染色体からセントロメア DNA が切り出される（図 1B）。セントロメア DNA を消失した染色体は細胞増殖時に不分離によって細胞から脱落する。染色体が脱落した細胞は生育必須遺伝子を含む多数の遺伝子を失い致死となる。一倍体細胞では、染色体 1 本からセントロメア DNA を切り出すことで、細胞死を誘導できる。一方、二倍体細胞では、相同染色体の両方からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導できる。実際に、第 IV 番染色体に RS を挿入し、*R*-発現プラスミド pHM209 を導入した一倍体細胞（YCD101 株）を SGal プレートと SGlc プレートに広げ培養すると、SGlc プレートでは、多数のコロニーが出現するが、SGal プレートでは、コロニーはほとんど出現しない。また、RS を挿入していない株（YCD103 株）や *R*-発現プラスミドの *R* 遺伝子を破壊した株（YCD102 株）では、SGal プレートでも多数のコロニーが出現する。プレートに出現したコロニーの数から生存率（SGlc プレートに出現したコロニーの数に対する SGal プレートに出現したコロニーの数）は、YCD101 株で  $1.4 \times 10^{-5}$  と大きく低下したが、YCD102 株と YCD103 株ではおよそ 1 となり、セントロメア DNA の切り出しによって細胞死が起こる。さらに、それら 3 株は、全て SGlc 液体培地でよく増殖するが、SGal 液体培地では、YCD102 株と YCD103 株は増殖が遅く、YCD101 株はほとんど増殖しない。また、培養 0 時間での生存細胞の数に対する生存細胞の相対数である相対生存率は、YCD101 株の SGal 液体培地で培養時間に伴って低下し、培養 8 時間後には約  $6 \times 10^{-4}$  となる。しかし、他の 2 株の相対生存率は 1 以上である。SGal 培地で、第 IV 番染色体からセントロメア DNA が切り出されることは、パルスフィールドゲル電気泳動法で分離した染色体 DNA のサザン解析で確認している。また、プレート培養において第 V 番染色体からの切り出しでも同様の結果が得られている（YCD105 株、生存率： $2.3 \times 10^{-5}$ ）。このように、染色体からセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を起こすことができる。細胞死の誘導システムは、GMO に条件致死性質や不稔性質を付与して、GMO が自然環境で拡散することを防止できる可能をもつと考えられる。しかし、実用化に向けて、生存率をできる限り下げることが重要である。YCD101 株を SGal プレートに広げ培養したとき、僅かな数のコロニーが出現した。また、SGal 液体培地で培養した時、培養 50 時間後に増殖が回復し始めた。このように、セントロメア DNA の切り出しで細胞死を誘導している時に生存細胞が出現する。生存率をさらに低下させる方法を考案するために、本研究では生存細胞が出現する原因を検討することにした。一倍体細胞（YCD101 株）を SGal プレートで培養した時に出現した 5 個の生存細胞クローンについて解析した。まず、レコンビナーゼ発現プラスミドの機能について検討した（表 4）。生存細胞に、pHM209（*TRP1* マーカー）と選択マーカーが異なるレコンビナーゼ発現プラスミドの pHM153（*LEU2* マーカー）を導入しても細胞死は起こらなかった。しかし、生存細胞から回収した pHM209 を、RS を持つ株（*CEN4* が RS-*CEN4*-*HIS3*-RS に置換、YCD100 株）に導入すると細胞死が起こった。したがって、5 個の生存細胞クローンのすべてにおいてレコンビナーゼ発現プラスミドは機能しており、染色体に原因があると考

表 4 *R*-発現プラスミドの機能解析

生存細胞クローン	生存率 (SGal プレート/SGlc プレート)		
	生存細胞	生存細胞 (pHM153)	KA311A (RS- <i>CEN4</i> - <i>HIS3</i> -RS, 生存細胞から回収した pHM209)
クローン 1	1.0 ± 0	1.0 ± 0.1	1.6 × 10 <sup>-5</sup> ± 0.6 × 10 <sup>-5</sup>
クローン 2	1.0 ± 0	1.0 ± 0.1	1.3 × 10 <sup>-5</sup> ± 0.1 × 10 <sup>-5</sup>
クローン 3	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	2.4 × 10 <sup>-5</sup> ± 0.8 × 10 <sup>-5</sup>
クローン 4	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2	2.4 × 10 <sup>-5</sup> ± 1.2 × 10 <sup>-5</sup>
クローン 5	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0	1.7 × 10 <sup>-5</sup> ± 0.7 × 10 <sup>-5</sup>

数値は、平均値 ± SD (n ≥ 3) で表した。

えられた。次に、生存細胞クローンの染色体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動法で解析したが、染色体パターンに大きな差は認められなかった (図 2)。さらに、*CEN4* DNA あるいは *HIS3* 遺伝子をプローブとしてサザン解析を行った。*HIS3* 遺伝子は、本来第 XV 番染色体に存在するが、RS の挿入によって *CEN4* の隣にも組み込まれている。クローン 1~4 では、両方のプローブで第 IV 番染色体にシグナルが検出され、切り出しが起こっていないと考えられた。しかし、クローン 5 では *CEN4* プローブには第 IV 番染色体にシグナルが検出されたが、*HIS3* プローブは第 XV 番染色体にのみ検出された。また、*CEN4* プローブによるシグナルは他の 4 個のクローンに比べ弱く、位置も少し下に認められた。さらに第 IV 番染色体からのセントロメア DNA の切り出しが起こっているかを検討するために、生存細胞クローンのゲノム DNA を鋳型とし、また *CEN4*Hpa と *CEN4*Pvu をプライマーとしたセントロメア領域の PCR 解析を行った。RS を挿入した株では、3.0 kb の DNA が増幅され、もし、セントロメア DNA の切り出しが起こったならば、増幅 DNA のサイズは 0.8 kb と小さくなる (図 3A)。クローン 1~4 では、3.0 kb の DNA が増幅され、クローン 5 では 0.8 kb の DNA が増幅された (図 3B)。これらの結果から、クローン 5 では切り出しが起こり、クローン 1~4 では切り出しが起こっていないことが示される。さらに、セントロメア DNA の両側に存在する RS のシーケンス解析を行った結果、クローン 1~4 では、2 個の RS のうち一方が第 IV 番染色体から欠失しており、クローン 5 では 2 個の RS 間の組換えによって正確に切り出しが起こっていることが明らかとなった (図 4A)。したがって、クローン 1~4 では第 IV 番染色体からの RS の欠失によって切り出しが起こらなかった。驚くことに、4 個のクローンとも同じ塩基配列が欠失していた (図 4B、2 個の 5'-TCGA-3' 配列で挟まれた領域)。欠失配列から、RS の両側に存在する 2 個の 5'-TCGA-3' 配列の間での組換えによって RS が欠失したと推察できる。したがって、染色体から 5'-TCGA-3' 配列を欠失したり、5'-TCGA-3' 配列を異なる塩基配列に換えることで RS の欠失を

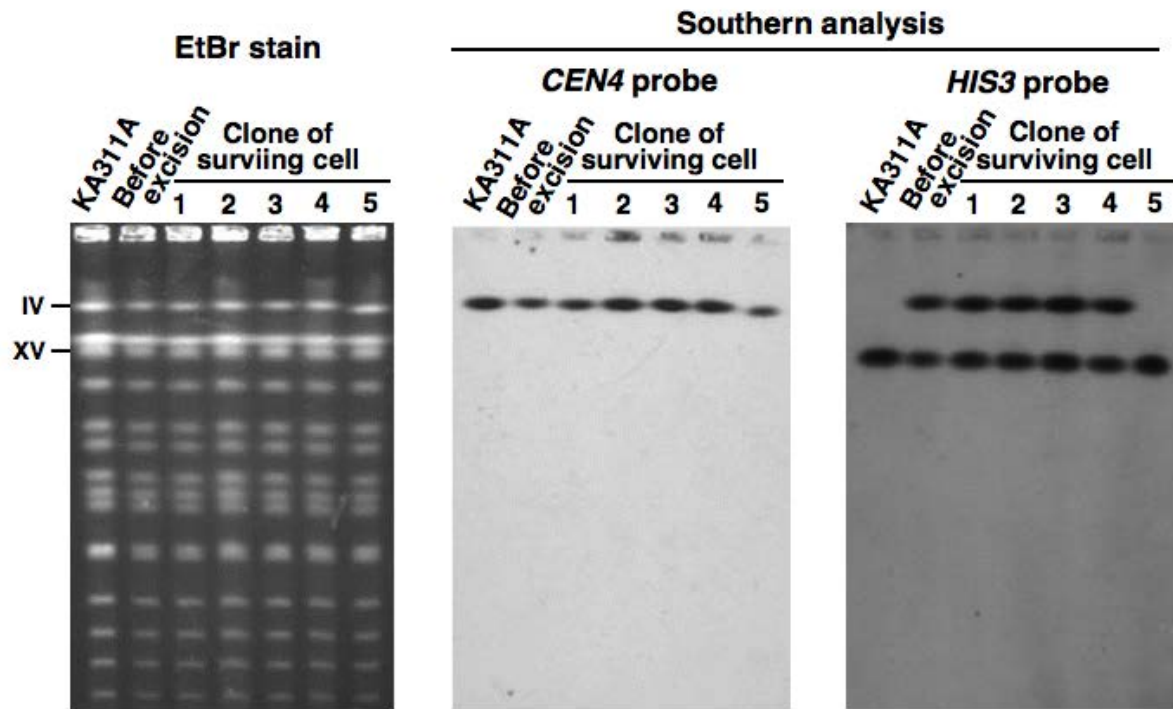


図 2 パルスフィールドゲル電気泳動法による生存細胞クローンの染色体 DNA の解析 酵母 KA311A 株 (KA311A)、YCD101 の切り出し誘導前の株 (Before excision)、5 個の生存細胞クローンの細胞から調製した染色体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動法で分離した後、臭化エチジウムで染色した (左側のパネル)。DNA をナイロンメンブレンに移した後、DIG 標識した 513 bp *CEN4* DNA (中央のパネル) および 531 bp *HIS3* DNA (右側のパネル) をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

抑制することが可能であると考えられる。さらに、46 個の生存細胞クローンについて解析中であるが、この結果を含めると約 70% のクローンが RS の欠失により切り出しが起こらなかったと推察できる。したがって、RS の欠失を抑制することによって生存率を約 3 分の 1 に低下でき、YCD101 株ではプレート培養での生存率は約  $4 \times 10^{-6}$  に低下すると想定される。また、YCD101 株の液体培養での培養 50 時間後の増殖の回復も抑えられると考えられる。クローン 5 では、セントロメア DNA の切り出しが起こり、パルスフィールドゲル電気泳動の結果から、切り出されたセントロメア DNA (*CEN4* DNA) が第 IV 番染色体上のどこかの位置に組み込まれた可能性が考えられた。しかし、インバース PCR 法を用いて組み込まれた位置を決定しようとしたが、DNA が増幅されなかった。さらに、*CEN4* の centromere DNA element (CDE) の両端部分をプライマー (CEN4CDERC と CEN4CDELC) として PCR を行ったが、DNA は増幅されなかった (図 3C)。これらの結果から、クローン 5 では、新たなセントロメア (ネオセントロメア) が形成されたり、他の染色体のセントロメア DNA が利用された可能性がある。クローン 5 は、核型進化やネオセントロメアの形成の観点から興味深い。生存細胞が出現するメカニズムとして次のよう、

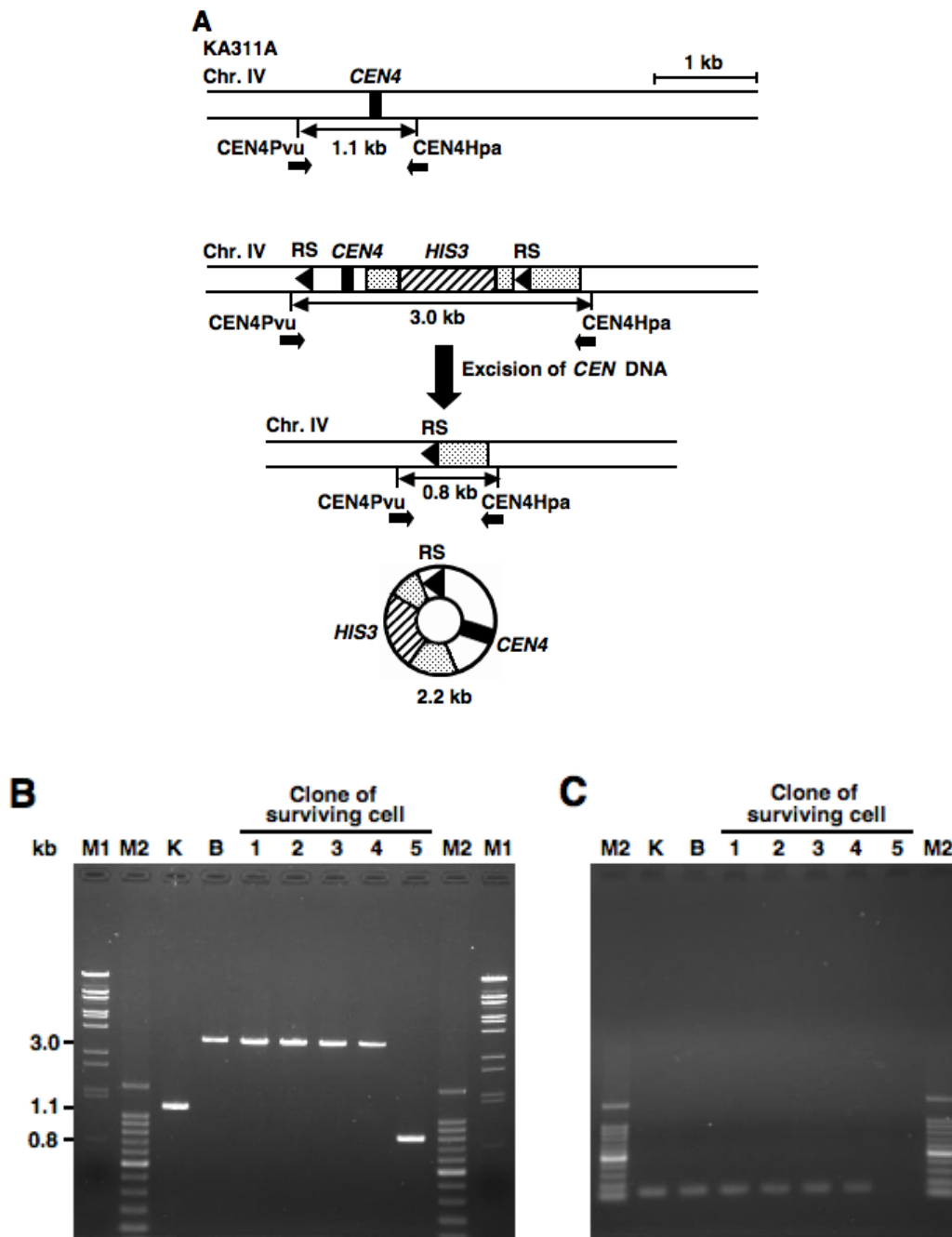


図3 生存細胞クローンの染色体 DNA の PCR 解析 A. YCD101 細胞における第 IV 番染色体からのセントロメア DNA の切り出しの方法 B. PCR 解析 酵母 KA311A 株 (K)、YCD101 の切り出し誘導前の株 (B)、5 個の生存細胞クローンの細胞のゲノム DNA を鋳型として、またプライマーとして CEN4Pvu と CEN4Hpa を使用して PCR 解析を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、臭化エチジウムで染色した。M1;  $\lambda$ -BstPI 消化 DNA. M2; 100 bp DNA ラダー C. PCR 解析 酵母 KA311A 株 (K)、YCD101 の切り出し誘導前の株 (B)、5 個の生存細胞クローンの細胞のゲノム DNA を鋳型として、またプライマーとして CEN4CDERC と CEN4CDELIC を使用して PCR 解析を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、臭化エチジウムで染色した。

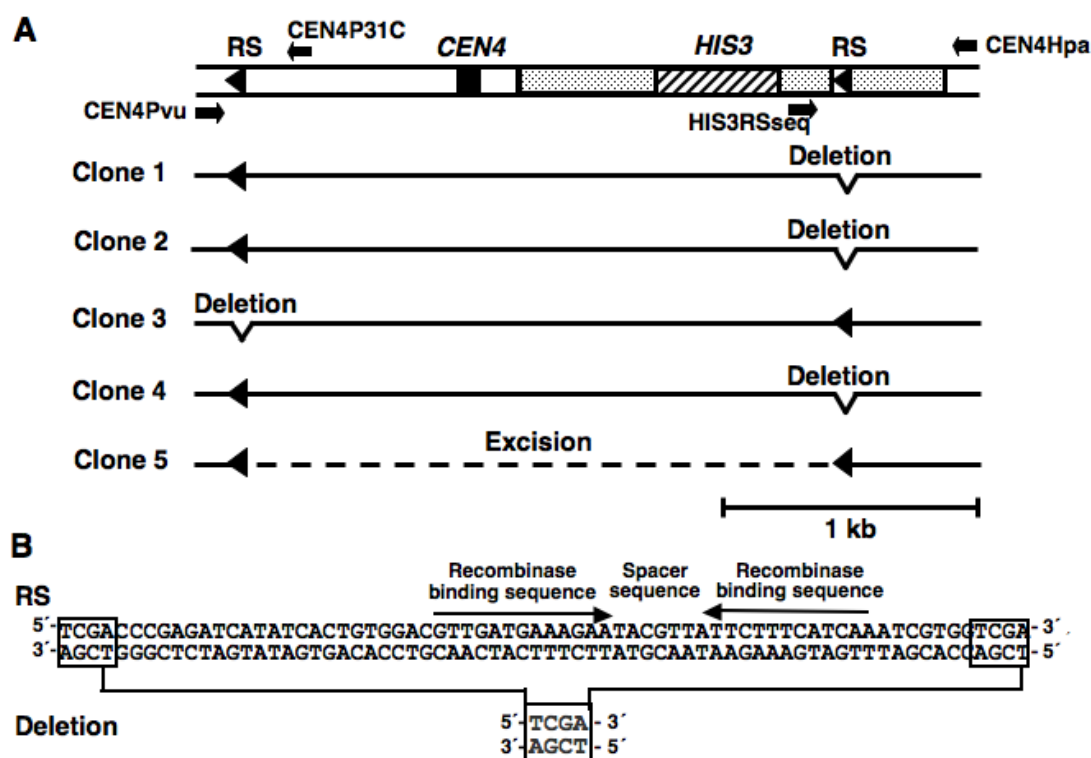


図4 生存細胞クローンの *CEN4* 領域のシーケンス解析

な可能性が考えられる。(1) 第IV番染色体からのRS DNAの欠失によって切り出しが起こらない。(2) レコンビナーゼ発現プラスミドにある  $P_{GALI-R}$  遺伝子の発現が生存細胞で抑制されている。(3) 染色体から切り出された *CEN4* DNAをもつDNA断片が第IV番染色体のどこかの位置に組み込まれた。(4) *CEN4* DNAが切り出された後、第IV番染色体のどこかの位置に新たにセントロメアDNAが形成された(ネオセントロメアが形成された)。(5) 切り出しによって *CEN4* DNAを失った染色体が他の染色体に融合した。5個の生存細胞クローンの解析から、クローン1~4は、メカニズム(1)によって出現し、クローン5は、メカニズム(4)によって出現した可能性がある。また、*S. pombe* では、一倍体細胞で染色体からセントロメアDNAを切り出し、セントロメア機能を喪失させることで、テロメアに新たなセントロメアが形成されたり、セントロメアDNAを失った染色体が他の染色体と融合する現象が観察されている(メカニズム(4)と(5)に相当する)<sup>19)</sup>。したがって、これらの現象は、*S. cerevisiae* でも起こり得る。一方、*S. pombe* の実験では、セントロメアDNAの切り出しが起こった細胞だけを選択して解析しているので、染色体からのRS DNAの欠失(メカニズム(1))やレコンビナーゼ遺伝子の発現の抑制(メカニズム(2))は観察できず、これらの現象が *S. pombe* で起こるかは不明である。さらに、出現割合に統計的な正確度を高めるためにさらに46個の生存細胞クローンについて解析を行った。

現在解析中であるが、51 個中の約 70% (36 個) のクローンで 2 個の RS のうち一方が欠失しており、しかも欠失配列は同じであった。この他に、RS 内に点突然変異が生じて切り出しが起こらなかったと考えられるクローン、切り出しが起こっておらず、RS の塩基配列にも異常が認められず、レコンビナーゼの発現に原因が考えられるクローン、切り出しが起こり、切り出されたセントロメア DNA あるいは他の染色体のセントロメア DNA の挿入、染色体の融合、ネオセントロメアの形成などが起こっているかもしれないクローンが、僅かな頻度で出現した。これらの現象を抑制することで生存率を低下させる可能性がある。生存細胞の出現を抑制することに加え、複数の染色体からセントロメア DNA を切り出すこと（たとえば、第 IV 番と第 V 番染色体から切り出す）が生存率の低下に効果的であると考えられる。これらのことから、生存率は、一般に滅菌基準として定義されている値の  $10^6$  以下に低下させることができるであろう。二倍体細胞における RS の欠失の頻度は、RS の個数から一倍体の 2 倍になると考えられる。二倍体の生存率が高い理由は、おもに相同染色体の両方からセントロメア DNA が同時あるいはほぼ同時に欠失しなければならないためであると考えられる。メカニズム (2) は一倍体と二倍体との生存率の差に影響を及ぼさないと考えられる。

GMO が自然環境に漏出した時、染色体からセントロメア DNA の切り出しを誘導するために、R 遺伝子のプロモーターが強い光、特定の波長の光、安全性の高い特定の化学物質（たとえば、微生物のタンク培養の場合）誘導されるプロモーターに置き換えるのがよい。そのようなプロモーターを得るために、酵母のゲノム DNA から最適なものをスクリーニングする必要がある。さらに、減数分裂に特異的な遺伝子のプロモーターを利用した発現によって不稔性を付与することができる。生存率をできる限り低下させ、レコンビナーゼの発現を適切にすることで実用化を目指す。

## 文 献

- 1) Matsuzaki, H., Araki, H., and Oshima, Y. Gene conversion associated with site-specific recombination in yeast plasmid pSR1. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 955-962 (1988).
- 2) Araki H, Nakanishi N, Evans BR, Matsuzaki H, Jayaram M, and Oshima Y. Site-specific recombinase, R, encoded by yeast plasmid pSR1. *J. Mol. Biol.*, **225**, 25-37 (1992).
- 3) Matsuzaki, H., Nakajima, R., Nishiyama, J., Araki, H., and Oshima, Y. Chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid. *J. Bacteriol.*, **172**, 610-618 (1990).
- 4) Oshima, Y., Araki, H., and Matsuzaki, H., Chromosome engineering in yeast with a site-specific recombination system from a heterologous yeast plasmid. *Methods Mol. Biol.*, **53**, 217-225 (1996).
- 5) Onouchi, H., Yokoi, K., Machida, C., Matsuzaki, H., Oshima, Y., Matsuoka, K., Nakamura, K., and Machida, Y. Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6373-6378 (1991).
- 6) Toriyama, K., Chiba, A., and Nakagawa, Y., Visualization of somatic deletions mediated by R/RS site-specific

recombination and induction of germinal deletions caused by callus differentiation and regeneration in rice. *Plant Cell Rep.*, **21**, 605-610 (2003).

- 7) Hieter, P., Pridmore, D., Hegemann, J. H., Thomas M., and Davis, R. W. Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA. *Cell*, **42**, 913-921 (1985).
- 8) Cottarel, G., Shero, J. H., Hieter, P., and Hegemann, J. A 125-base-pair *CEN6* DNA fragment is sufficient for complete meiotic and mitotic centromere functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3342-3349 (1989).
- 9) Torras-Llort, M., Moreno-Moreno O, and Azorin, F. Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *EMBO J.*, **28**, 2337-2348 (2009).
- 10) Matsuzaki, H., Yamane, S., Hatano, T., Oshima, Y., and Fukui, S. Simple monitoring system for R-mediated site-specific recombination on chromosomes in *Saccaromyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1632-1637 (1994).
- 11) Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).
- 12) Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168 (1983).
- 13) Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P., "Methods in Yeast Genetics, a Laboratory Course Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1990).
- 14) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491 (1988).
- 15) Sanger, F., and Coulson, A. R., A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **94**, 441-448 (1975).
- 16) Carle, G. F., Olson, M. V., Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 5647-5664 (1984).
- 17) Chu, G., Vollrath, D., and Davis, R. W., Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*, **234**, 1582-1585 (1986).
- 18) Southern, E. M., Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 19) Ishii, K., Ogiyama, Y., Chikashige, Y., Soejima, S., Masuda, F., Kakuma, T., Hiraoka, Y., and Takahashi, K., Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere dysfunction. *Science*, **321**, 1088-1091 (2008).

\*\*\*\*\*  
Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (12), 1-16 (2013)

**Analysis for surviving cells appeared with induction of excision of centromeric DNA  
from a chromosome in *Saccharomyces cerevisiae***

Akihiro Miyamoto, Toshiaki Yanamoto, Takushi Hatano, Hiroaki Matsuzaki

Department of Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology,  
Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

Many kinds of genetically modified organisms (GMOs) are used in agriculture and production of enzymes and pharmaceutical drugs today. If GMOs are spread over natural environment, it is apprehensive to affect the natural environment. To prevent the spread of GMOs by introduction of lethality, we examined whether it is possible to cause cell death by excising centromeric DNA from a chromosome by a site-specific recombination in *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. We constructed haploid cells in which the centromeric DNA could be excised from the chromosome IV by cultivation in galactose medium. The viability of these cells was greatly reduced when cultivated in galactose medium and cell death could occur by excising the centromeric DNA from chromosome IV. However, when cells were cultivated on a galactose plate to induce the excision of centromeric DNA from the chromosome IV, an extremely small number of colonies were appeared. Thus, we examined the reason for appearance of the viable cells. Pulsed-field gel electrophoresis of the chromosomal DNA, PCR analysis, and sequence analysis for DNA near the centromere were performed on the surviving cells in the case of chromosome IV. The main reason is thought that the excision could not occur due to deletion of one of the two RSs. The viability may be reduced by suppression of these phenomena.

**Key words: cell death, surviving cell, centromere, site-specific recombination**